

А.А.Чиркин, Е.О.Данченко,
Е.М.Дорошенко, Н.К.Луняк

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ЭКСТРАГИРОВАНИЯ НА СПЕКТР АМИНОКИСЛОТ СУХОГО ЭКСТРАКТА ТРАВЫ СОЛЯНКИ ХОЛМОВОЙ

Витебский государственный медицинский университет
Институт биохимии НАН Беларуси, Гродно
ММА им. И.М.Сеченова, Москва

Изучен аминокислотный спектр двух образцов сухого экстракта травы солянки холмовой, которые получены с помощью разных технологий. Установлено, что аминокислотный состав сухого экстракта солянки холмовой приближается к биологически полноценным аминокислотным смесям. В зависимости от способа получения изменяется количество свободных аминокислот, но их спектр сохраняется.

В предыдущем исследовании методом катионообменной хроматографии был изучен спектр аминокислот препаратов травы солянки холмовой (*Salsola collina* Pall.). Установлено присутствие незаменимых аминокислот, аминокислот с разветвленными радикалами (используются преимущественно нервной тканью), орнитина, аспартата и цитруллина (обеспечивают мочевинообразование в печени) и аланина, являющегося ключевой аминокислотой глюконеогенеза. При анализе различных препаратов найдены существенные колебания в спектре определяемых аминокислот [1]. В связи с этим целью работы явилась сравнительная оценка спектров аминокислот из сухих экстрактов травы солянки холмовой, полученных разными технологиями.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экстракт травы солянки холмовой получали с использованием двух технологий:

- 1) традиционная водно-спиртовая экстракция методом ускоренной дробной мацерации с последующим сгущением на вакуум-выпарном аппарате с сушкой в вакуум-сушильном шкафу;
- 2) водная экстракция в пульсирующем слое с последующей сушкой и лиофилизацией методом распыления.

В работе использовали: стандарты аминокислот, биогенных аминов и их метаболитов фирм Fluka, Serva, Sigma, Reanal; остальные реактивы - отечественного производства (квалификации не ниже хч) или фирмы «Lachema» (ЧСФР). Стандартные растворы аминокислот производства фирм «Calbiochem» и «Fluka AG». Буферные растворы, а также растворы стандартов готовили с использованием воды для ВЭЖХ, полученной тройной дистилляцией в стеклянном аппарате с последующим пропусканием через патрон «Norganic» и фильтрованием через мембранный фильтр NATF 0,45 мкм (Millipore, США). Прием и обработка хроматографических данных осуществлялась с помощью программно-аппаратного комплекса «Мультихром-1» (а/о «МультиХром», г.Москва; версия программного обеспечения - 2.67).

Образцы гомогенизировались при 800 об/мин в гомогенизаторе со стеклянным пестиком в 10 объемах 0,2М HClO₄, с добавлением внутреннего стандарта (n-Leu) из расчета 12,5 мМ/г образца. После этого полученный экстракт отделяли от осадка. Полученные таким образом безбелковые экстракты для определения фонда свободных аминокислот хранились до анализа при температуре -20°C.

Количественная и качественная идентификация свободных аминокислот и их дериватов проводилась катионообменной хроматографией одноколоночным методом на автоанализаторе аминокислот Т-339М (ЧСФР) по модифицированному методу Benson J.V., Paterson J.A. (1974) [2]. Принцип метода заключается в элюции аминокислот и родственных им соединений ступенчатым градиентом Li-цитратных буферных растворов. После нанесения кислотного экстракта на аналитическую колонку (22,0 г 0,35 см), заполненную сферическим катионообменником LGAN 2В (размер частиц 8 мкм) («Lachema», ЧСФР) хроматографическое разделение исследуемых соединений последовательно осуществлялось Li-цитратными буферами. Скорость потока растворов 14 мл/час, рабочее давление на колонке 2,5-3,5 МПа. Температура анализа дискретно повышалась в середине аналитического цикла с 40 до 62 °С. Количественное содержание каждо-

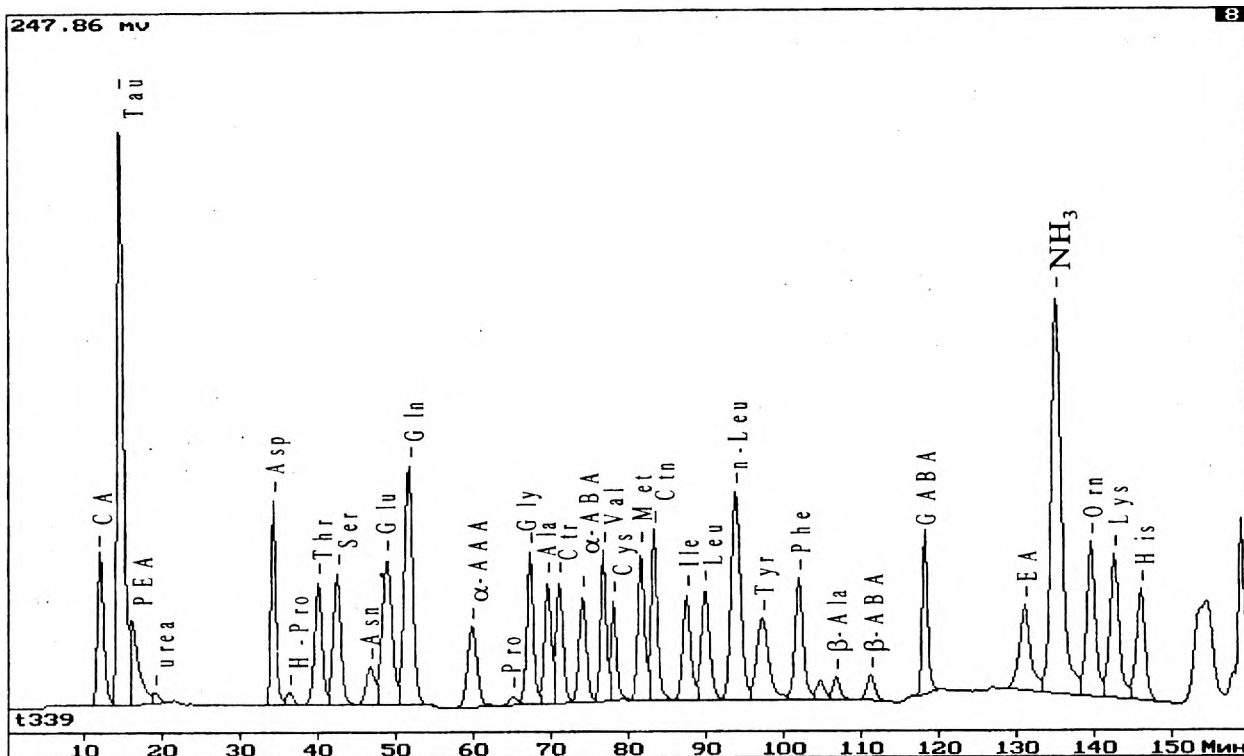


Рис.1. Хроматограмма стандартной смеси аминокислот при разделении их методом ионообменной хроматографии.

го компонента спектра исследуемых соединений оценивалось по реакции с 1% раствором нингидрина (скорость потока 12 мл/час) в капиллярной бане при 100°C при длине волны 520 нм после прохождения через проточную кювету однолучевого фотометра. Сигнал с выхода фотометра поступал на программно-аппаратный комплекс «Мультихром-1», где происходила регистрация, обработка, идентификация пиков и вычисление концентраций по площадям пиков.

Качественная идентификация и количественная оценка полученных значений производилась программой путем сравнения результатов анализа исследуемых биологических объектов со стандартной калибровочной кривой искусственной смеси аминокислот и нингидринположительных компонентов. Последняя содержала равные количества определяемых соединений по 250 нмоль/мл каждого и в качестве внутреннего стандарта в нее добавляли в той же концентрации норлейцин (концентраты стандартных смесей фирмы «Calbiochem», США).

В описанной системе последовательно элюировались и определены следующие соединения: цистеиновая кислота (CA), таурин (Tau), фосфоэтаноламин (PEA), мочеви́на (urea), аспарагиновая кислота (Asp), ОН-пролин (H-Pro), треонин

(Thr), серин (Ser), аспарагин (Asn), глутаминовая кислота (Glu), глутамин (Gln), α-амино-адипиновая кислота (α-AAA), пролин (Pro), глицин (Gly), аланин (Ala), α-аминомасляная кислота (α-ABA), цитруллин (Ctr), валин (Val), цистин (Cys), метионин (Met), цистатионин (Ctn), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), норлейцин (n-Leu), β-аланин (β-Ala), β-аминомасляная кислота (β-ABA), γ-аминомасляная кислота (GABA), этаноламин (EA), аммиак (NH₃), орнитин (Orn), лизин (Lys) и гистидин (His). Хроматограмма стандартной смеси аминокислот представлена на рис.1. Весь цикл аналитического процесса (включая регенерацию колонки 0,2 Н LiOH и ее стабилизацию стартовым 0,2 М Li-цитратным буфером pH 2,8) составил 200 мин. Воспроизводимость метода ±1,5%, чувствительность - 10⁻⁹ моль. Реагенты готовились из коммерческих комплектов для определения свободных аминокислот («Lachema») на деионизованной воде, которая перед использованием была подвергнута двойной дистилляции.

На рисунке 1 представлена типичная хроматограмма смеси аминокислот при разделении их методом катионообменной хроматографии.

Гидролиз белков проводили путем добав-

ления 10-кратного избытка концентрированной HCl с последующим нагреванием до 100°C в течение 24 ч без доступа воздуха, после чего гидролизат упаривали в вакууме и сухой остаток растворяли в среде для гомогенизации. Дальнейший ход определения аналогичен таковому при определении свободных аминокислот.

Таблица 1

**Свободные аминокислоты
экстрактов травы солянки холмовой
(нмоль/г сухого вещества).**

Определяемое вещество	Технология 1	Технология 2
СА (цистеиновая кислота)	4100	7688
Tau (таурин)	1245	1490
PEA (фосфоэтаноламин)	1500	1433
Urea (мочевина)	2635	2580
Asp (аспартат)	6999	4151
Hpro (гидроксипролин)	1990	1825
Thr (треонин)	8215	1460
Ser (серин)	6570	2775
Asn (аспарагин)	1321	188
Glu (глутамат)	11230	730
Gln (глутамин)	5500	6998
Pro (пролин)	1990	1820
Gly (глицин)	820	1825
Ala (аланин)	14665	3803
Ctr (цитруллин)	1420	572
A-ABA (α -аминобутират)	1325	106
Val (валин)	11900	10993
Cys (цистеин)	805	1672
Met (метионин)	730	1559
Ile (изолейцин)	7520	1160
Leu (лейцин)	10860	1726
Tyr (тирозин)	5730	779
Phe (фенилаланин)	7860	649
B-Ala (β -аланин)	1210	336
GABA (γ -аминобутират)	785	1222
Аммиак	59770	35992
Orn (орнитин)	2105	607
Lys (лизин)	4815	850
His (гистидин)	695	787
Сумма	129295	63424

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр свободных аминокислот экстрактов солянки холмовой представлен в таблице 1.

Анализ материалов таблицы 1 показал, что при технологии 2 фонд свободных аминокислот в два раза меньше, чем при технологии 1, за счет меньшего содержания треонина, серина, аспарагина, глутамата, аланина, α -аминобутирата, метионина, изолейцина, лейцина, тирозина, фенилаланина, β -аланина, орнитина и лизина. Оба препарата содержат по 7 из 8 незаменимых аминокислот. При использовании технологии 2 получено более высокое содержание метионина по сравнению с технологией 1, одинаковое количество валина и сниженное содержание остальных незаменимых аминокислот. Препарат, полученный по технологии 2, проигрывает также по спектру гепатотропных аминокислот (снижено содержание цитруллина и орнитина).

При использовании метода обращенно-фазной хроматографии (ВЭЖХ-система "Waters" фирмы Millipore-Waters, США) свободные аминокислоты экстракта, полученного по технологии 2, распределялись в последовательности: треонин, γ -аминобутират, аспарагин, глутамат, серин, аспартат, аланин, глицин, β -аланин, глутамин, таурин.

На рисунке 2 представлен спектр аминокислот гидролизата экстракта солянки холмовой.

Количественное содержание аминокислот в гидролизате экстракта солянки холмовой представлено в таблице 2.

В гидролизате экстракта травы солянки холмовой оказалось относительно высокое содержание 7 незаменимых аминокислот, а также аланина, гепатотропных – цитруллина и орнитина, полузаменимых аминокислот (гистидин, тирозин).

Спектры свободных аминокислот и аминокислот гидролизатов существенно отличаются. По количественному содержанию основные свободные аминокислоты экстракта солянки холмовой распределяются в последовательности: валин, цистеиновая кислота, глутамин, аспартат, γ -аминомасляная кислота, аланин, серин, гидроксипролин, глицин, пролин, лейцин, цистеин, метионин, таурин, треонин. Аминокислотный состав гидролизата сухого экстракта солянки холмовой: глицин, аспартат, глутамат, аланин,

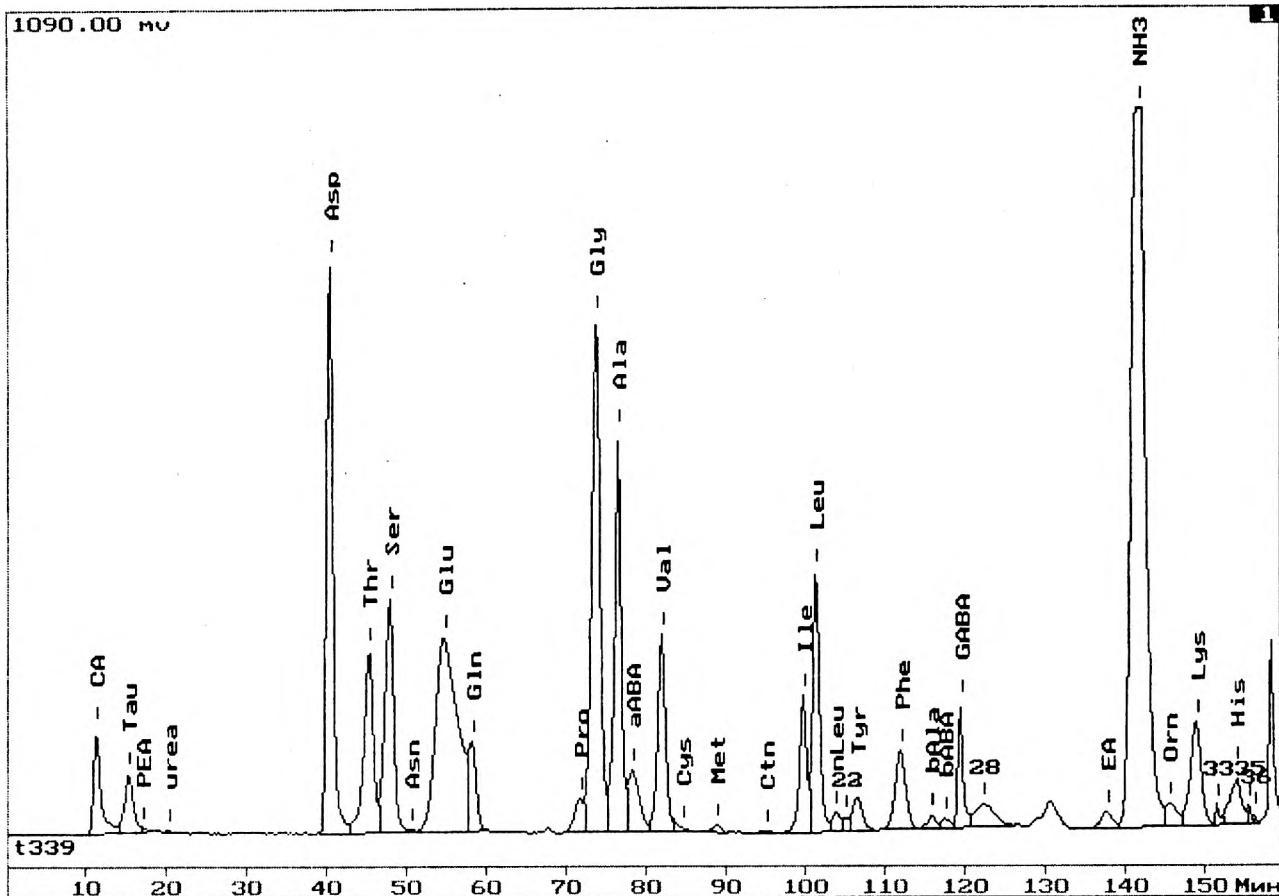


Рис. 2. Хроматограмма гидролизата белков экстракта солянки холмовой.

глутамин, серин, валин, пролин, тирозин, изолейцин, лизин, фенилаланин, таурин, гистидин. В гидролизате не обнаружен гидроксипролин.

Таким образом, аминокислотный состав сухого экстракта солянки холмовой приближается к биологически полноценным аминокислотным смесям. В зависимости от способа получения изменяется количество свободных аминокислот, но их спектр сохраняется.

Таблица 2

Содержание аминокислот в гидролизате экстракта из травы солянки холмовой

Определяемые вещества	Концентрация	
	Нмоль/г	Мкг/г
CA	2311,88	391,169
Tau	1924,79	240,599
PEA	99,1171	13,985
Urea	548,685	32,921
Asp	13328,1	1772,632
Thr	5599,63	666,356
Ser	6576,63	690,546
Asn	133,258	17,590
Glu	11059,5	1614,686

Таблица 2 (продолжение)

Gln	10454,3	1536,787
Pro	5864,86	674,459
Gly	16504,2	1237,817
Ala	10759,7	957,610
α ABA	2566,28	264,327
Val	6472,38	757,268
Cys	499,832	119,960
Met	210,244	31,326
Ctn	97,9768	21,751
Ile	3552,22	465,340
Leu	5958,78	780,601
Tyr	1123,25	203,309
Phe	3087,39	509,419
β Ala	1688	150,232
GABA	2379,48	245,325
EA	1092,45	66,639
NH ₃	49426,5	840,251
Orn	716,842	94,623
Lys	3210,79	468,776
His	2223,7	344,674
Сумма	169470,7	15210,98

1. Чиркин А.А., Данченко Е.О., Шейбак В.М. Аминокислотный состав препаратов солянки холмовой и их применение для коррекции возрастных изменений метаболизма // Вестник фармации. – 1998. – № 4. – С. 24-30.
2. Бенсон Дж., Патерсон Дж. Хроматографический анализ аминокислот и пептидов на сферических смолах и его применение в биологии и медицине / Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков. – М., 1974. – С. 9-84.

A.A.Chirkin, E.O.Danchenko, E.M.Doroshenko,
N.K.Lunjak

INFLUENCE OF EXTRACTION WAY ON A SPECTRUM OF AMINO ACIDS OF A DRY EXTRACT OF A GRASS SALSOLA COLLINA PALL

The aminoacidic spectrum of two samples of a dry extract of a grass *Salsola collina* Pall is investigated which are obtained with the help of different technologies. Fixed, that the aminoacidic composition of a dry extract *Salsola collina* Pall comes nearer to biologically high-grade aminoacidic admixtures. The amount of free amino acids changes depending on a way of reception, but their spectrum is kept.

Е.О.Данченко

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА СОЛЯНКИ ХОЛМОВОЙ НА БИОСИНТЕЗ ДНК И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Витебский государственный медицинский университет

В эксперименте на крысах показано, что экстракт солянки холмовой предупреждает гепатотоксические эффекты этанола путем активации ферментов неокислительной ветви пентозофосфатного пути, глюкокиназы, что сопряжено с тенденцией к нормализации биосинтеза ДНК.

Препараты из солянки холмовой (*Salsola Collina* Pall.) семейства маревых (*Chenopodiaceae*) включают свободные стерины, гликозиды, флавоноиды, алкалоиды, жирные кислоты, каротиноиды, сапонины, калий, неорганические соли кальция, магния, алюминия [11], широкий спектр аминокислот и фосфолипидов [13,14]. Экстракт солянки холмовой (ЭСХ) является перспективным гепатопротекторным средством для фармакотерапии заболеваний печени, вызванных токсическими агентами и по антинекротическому влиянию превосходит легалон и силибор [12]. ЭСХ снижает перекисное окисление липидов, восстанавливает высокую активность антирадикальной защиты мембран, стимулирует экскреторную и антитоксическую функции печени, значительно ослабляет синдром цитолиза гепатоци-

тов [2, 11], обладает инсулиноподобным эффектом [22]. Показано корригирующее влияние ЭСХ на метаболизм липидов в печени крыс при алкогольной интоксикации [13].

Этанол вызывает изменение метаболизма углеводов в печени и периферических тканях [7,8,9]. Наиболее выраженный эффект проявляется в нарушении утилизации глюкозы [31,32], что сопровождается ингибированием окисления липидов и белков и развитием инсулинорезистентности [28]. Действие этанола на регенерацию связывают с повреждением мембран, которое обусловлено липидной пероксидацией, изменением внутриклеточного гомеостаза глутатиона и нарушением митохондрий [23]. Роль пентозофосфатного пути как источника образования фосфорибозилпирофосфата и метаболизма нуклеиновых кислот изучена недостаточно.

Целью настоящей работы было изучение влияния препарата ЭСХ на биосинтез ДНК в печени и активность ферментов углеводного обмена при хронической алкогольной интоксикации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты поставлены на белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г. Животные находились на стандартной лабораторной диете и получали воду *ad libitum*. Хроническую алкогольную интоксикацию вызывали интрагастральным введением 25% раствора этанола в дозе 3,5 г/кг массы на протяжении 56 дней с 10 до 11 часов утра. Части животным наряду с этанолом вводили экстракт солянки холмовой в дозе 200 мг/кг (с 15 до 16 ч). Контрольные животные